

525000

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. März 2004 (18.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/022588 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/415**,
A61K 39/36, C12N 15/29, 5/10

(74) Gemeinsamer Vertreter: **MERCK PATENT GMBH**,
Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP2003/008471**

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
31. Juli 2003 (31.07.2003)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
02018157.4 19. August 2002 (19.08.2002) **EP**

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **MERCK PATENT GMBH** [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SUCK, Roland** [DE/DE]; Gellerstrasse 15, 22301 Hamburg (DE). **FIEBIG, Helmut** [DE/DE]; Bäckerweg 10, 21493 Schwarzenbek (DE). **CROMWELL, Oliver** [DE/DE]; Loenshöhe 2, 21465 Wentorf (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **VARIANTS OF THE MAJOR ALLERGEN PHL P 1 FROM TIMOTHY GRASS**

(54) Bezeichnung: **VARIANTEN DES MAJORALLERGENS PHL P 1 AUS LIESCHGRAS**

(57) Abstract: The invention relates to pharmaceutically significant variants of the major allergen Phl p 1 from timothy grass, and is characterised in that the previously impossible production of monomer molecules which are stable and soluble in physiological media can be carried out by means of prokaryotic expression systems, and said molecules can be subsequently purified.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft pharmazeutisch bedeutsame Varianten des Majorallergens Phl p 1 aus Lieschgras, dadurch gekennzeichnet, daß eine bisher nicht mögliche Herstellung von monomeren, in physiologischen Medien löslichen und stabilen Molekülen mit Hilfe von prokaryontischen Expressionssystemen und deren anschließende Reinigung erfolgen kann.



WO 2004/022588 A1

Varianten des Majorallergens Phl p 1 aus Lieschgras

Die Erfindung betrifft Varianten des Majorallergens Phl p 1 aus Lieschgras, dadurch gekennzeichnet, daß eine bisher nicht mögliche Herstellung von monomeren, in physiologischen Medien löslichen und stabilen Molekülen mit Hilfe von prokaryontischen Expressionssystemen und deren anschließende Reinigung erfolgen kann.

Hintergrund der Erfindung

Allergien vom Typ 1 haben weltweite Bedeutung. Bis zu 25% der Bevölkerung von industrialisierten Länder leiden unter Beschwerden wie allergischer Rhinitis, Konjunktivitis oder Bronchialasthma, die durch in der Luft befindliche Allergene (Aeroallergene) unterschiedlicher Herkunft wie Pflanzenpollen, Milben, Katzen oder Hunden hervorgerufen werden. Bis zu 40% dieser Typ 1-Allergiker wiederum zeigen spezifische IgE (Immunoglobulin E)-Reaktivität bei Gräserpollen (Freidhoff et al., 1986, J. Allergy. Clin. Immunol. 78, 1190-201).

Bei den Typ 1-Allergie auslösenden Substanzen handelt es sich um Proteine, Glykoproteine oder Polypeptide. Diese Allergene reagieren nach Aufnahme über die Schleimhäute mit den bei sensibilisierten Personen an der Oberfläche von Mastzellen gebundenen IgE-Molekülen. Werden zwei IgE-Moleküle durch ein Allergen miteinander vernetzt, führt dies zur Ausschüttung von Mediatoren (z.B. Histamin, Prostaglandinen) und Zytokinen durch die Effektorzelle und damit zu den entsprechenden klinischen Symptomen.

In Abhängigkeit von der relativen Häufigkeit der Allergiker, die IgE-Antikörper gegen bestimmte Allergene aufweisen, wird zwischen Major- und Minorallergenen unterschieden. Im Fall vom Lieschgras (*Phleum pratense*) sind bislang Phl p 1 (Petersen et al., 1993, J. Allergy Clin. Immunol. 92, 789-796), Phl p 5 (Matthiesen und Löwenstein, 1991, Clin. Exp. Allergy 21, 297-307), Phl p 6 (Petersen et al., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108, 49-54) und Phl p 2/3 (Dolecek et al., 1993) als Majorallergene und

Phl p 4 (Löwenstein, 1978, Prog. Allergy 25, 1-62) sowie Gruppe 10 und 11 aus *Lolium perenne* (Ansari et. al., 1987, J. Allergy Clin. Immunol. 80, 229-235) als Minorallergene charakterisiert worden.

- 5 Als eine der relevantesten Allergengruppen von Gräserpollen wird Gruppe 1 eingestuft (Tamborini, E. et al., Eur. J. Biochem. 1997, 249:886-894), zu der Phl p 1 aus Lieschgras gehört. Zu Phl p 1 weisen die weiteren Vertreter der Gruppe 1 aus anderen Gräsern Homologien von teilweise über 95% auf (Petersen, A., et al., J. Allergy Clin. Immunol. 1995, 95: 987-994).
- 10 Aufgrund der hohen Homologien treten bei der Sensibilisierung mit einem Gras auch Reaktionen auf die Allergene anderer kreuzreaktiver Spezies auf. Deshalb sind diese Moleküle für entsprechende Diagnose- und Therapieansätze von übergeordneter Bedeutung.
- 15 Bei dem therapeutischen Einsatz dieser Allergene nutzt man die Reaktion mit T-Helferzellen, wobei es zu einer Umorientierung der pathologischen TH2-Zellen in den TH1-Typ kommt. Daraus ergibt sich eine Veränderung des Cytokinprofils derart, daß B-Zellen zur Bildung von IgG statt IgE stimuliert werden.
- 20 Ein klassischer Ansatz zur wirksamen therapeutischen Behandlung von Allergien stellt die Spezifische Immuntherapie oder Hyposensibilisierung dar (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (6), 336-339, Bousquet et al., 1998; J. Allergy Clin Immunol. 102(4), 558-562). Dabei werden dem Patienten natürliche Allergenextrakte in steigenden Dosen subkutan injiziert.
- 25 Allerdings besteht bei dieser Methode die Gefahr von allergischen Reaktionen oder sogar eines anaphylaktischen Schocks. Um diese Risiken zu minimieren, werden innovative Präparate in Form von Allergoiden eingesetzt. Dabei handelt es sich um chemisch modifizierte Allergenextrakte, die deutlich reduzierte IgE-Reaktivität, jedoch identische T-Zell-Reaktivität im Vergleich zum nicht behandelten Extrakt aufweisen (Fiebig, 1995, Allergo J. 4
- 30 (7), 377-382).

Eine noch weitergehende Therapieoptimierung wäre mit rekombinant hergestellten Allergenen möglich. Definierte, ggfs. auf individuelle Patienten abgestimmte Cocktails von hochreinen rekombinant hergestellten Allergenen könnten Extrakte aus natürlichen Allergenquellen ablösen, da diese
5 außer den verschiedenen Allergenen eine größere Zahl von immunogenen, aber nicht allergenen Begleitproteinen enthalten.

Realistische Perspektiven, die zu einer sicheren Hyposensibilisierung mit Expressionsprodukten führen können, bieten gezielt mutierte rekombinante Allergene, bei denen IgE-Epitope spezifisch deletiert werden, ohne die für
10 die Therapie essentiellen T-Zell Epitope zu beeinträchtigen (Schramm et al., 1999, J. Immunol. 162, 2406-2414).

Eine weitere Möglichkeit zur therapeutischen Beeinflussung des gestörten Th-Zell-Gleichgewichtes bei Allergikern ist die Behandlung mit expressionsfähiger DNA, die für die relevanten Allergene kodiert. Erste experimentelle
15 Belege für die allergenspezifische Beeinflussung der Immunantwort konnte an Nagern durch Injektion von Allergen-kodierender DNA erbracht werden (Hsu et al., 1996, Nature Medicine 2 (5), 540-544).

Bei Phl p 1 handelt sich um ein Protein aus 240 Aminosäuren und einer N-Glykosylierungsstelle. Die Glykosylierungsanteil beträgt 5% des Molekulargewichtes, welches bei dem natürlichen Protein ca. 30-35 kDa beträgt (Petersen et al., Allergy Clin. Immunol. 1995, 95: 987-994; Suck et al., J. Immunol. Meth. 1999, 229:73-80).
20

Die Nukleinsäuresequenz von Phl p 1 ist bekannt (Laffer et al., J. Allergy Clin Immunol. 1994, 94: 689-698; Petersen et. al., J. Allergy Clin. Immunol., 1995, 95: 987-94) und kann somit zur rekombinanten Herstellung des Moleküls genutzt werden.
25

Bisherige Versuche das Molekül in bakteriellen oder eukaryontischen Systemen, wie z.B. Hefe, rekombinant derart herzustellen, daß eine stabile
30

monomere Form erhalten wurde, waren jedoch wegen seiner mangelhaften Löslichkeit nicht erfolgreich:

Im Fall der bakteriellen Expression lagert sich Phl p 1 als Einschlußkörper (inclusion bodies) ab (Vrtala et al., J. Allergy Clin. Immunol, 1996; 97: 781-7) und muß vor der Reinigung zunächst denaturiert werden. Im Anschluß wird das Denaturierungsmittel entzogen. Eine vollständige Rückfaltung des Proteins in die natürliche lösliche Konformation konnte allerdings bisher nicht erreicht werden (Andersson, Lidholm, Int. Arch. Allergy Immunol. 2003;130:87-107).

Ein möglicher Hinderungsgrund für die Bildung einer stabilen Konformation hätte das Fehlen der Glykosylierung sein können. Jedoch wurde selbst in eukaryontischen Systemen, in denen Glykosylierung möglich ist, kein stabiles Phl p 1 erhalten (K. Grobe, Dissertation, 1998, Universität Hamburg).

Als eine Ursache für die fehlende Löslichkeit wird stattdessen eine proteolytische Aktivität vermutet, die zur Selbstdegradation des Moleküls führt (Grobe et al., Eur. J. Biochem. 1999; 263: 33-40; Kirsten Gehlhar, Dissertation, 1998, Medizinische Universität zu Lübeck, Deutschland). Daneben kommen auch hydrophobe Interaktionen zwischen den Molekülen als Ursache für die Aggregation in Frage.

Die der vorliegenden Erfindung zugrund liegende Aufgabe bestand somit in der Bereitstellung von Varianten des Majorallergens Phl p 1 aus Lieschgras, die sich bei vollem Erhalt der therapeutisch und diagnostisch bedeutsamen immunologischen Eigenschaften durch eine verbesserte Löslichkeit auszeichnen und die sich somit in pharmazeutisch geeigneter Form aufreinigen lassen.

Abbildungen

Abbildung 1: SDS-PAGE des Wildtyps nPhl p 1 (n=natürlich) sowie der Faltungsvarianten LM und HM der Allergenvariante rPhl p 1-A236C (r = rekombinant) unter reduzierenden (in Anwesenheit von Dithiothreitol DTT) und nicht reduzierenden (ohne DTT) Bedingungen.

Bahn 1: Molekulargewichtsstandard (10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160, 220 kDa, Bench Mark Protein Ladder, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Bahn 2: Extrakt aus *Phleum pratense*-Pollen

Bahn 3: nPhl p 1

Bahn 4: rPhl p 1-LM

Bahn 5: rPhl p 1-HM

Abbildung 2: Gelfiltration mit rPhl p 1-HM und rPhl p 1-LM an einer Sephacryl S100-Säule.

Die Abbildung zeigt, daß die beiden Faltungsvarianten unterschiedliche apparente Molekulargewichte aufweisen.

Abbildung 3: Enzym-Allergo-Sorbent-Test (EAST) zur Quantifizierung der IgE-Bindung der Faltungsvarianten rPhl p 1-A236C -LM und -HM

Auf der horizontalen Achse ist die Konzentration eines Inhibitors der IgE-nPhl p 1-Bindung in mol/l aufgetragen, auf der vertikalen Achse ist der Grad der Inhibierung in [%] angegeben. Die Messung erfolgte mit nPhl p 1 an der Festphase und einem typischen Serum eines Graspollenallergikers.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die Einführung eines zusätzlichen Cystein-Restes, vorzugsweise im carboxyterminalen Teil (insbesondere ab Aminosäureposition 140, ganz besondere bevorzugt zwischen

den Aminosäurepositionen 230 und 240) des Moleküls zu der erfindungsgemäß verbesserten Löslichkeit bei unveränderter IgE-Aktivität und T-Zell-Reaktivität führt.

Die Erfindung betrifft daher Varianten des Majorallergens Phl p 1 aus
5 Lieschgras, die gegenüber dem Wildtyp einen zusätzlichen Cys-Rest aufweisen, sowie von den Basismolekülen abgeleitete Fragmente und Varianten, die die gleichen oder ähnliche vorteilhafte Eigenschaften aufweisen.

10 Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Varianten des rekombinanten Majorallergens rPhl p 1, dadurch gekennzeichnet, daß nach an sich bekannten Methoden in das Phl p 1-Gen durch Insertion oder Austausch ein Basentriplett kodierend für einen Cys-Rest eingeführt wird, das so veränderte Gen in einem Wirtsorganismus überexprimiert wird und die durch Überexpression erhaltene Allergen-
15 variante gereinigt wird.

Die prokaryontische rekombinante Herstellung und Aufreinigung kann mit oder ohne einen gentechnisch eingeführten Fusionsanteil durchgeführt
20 werden und führt immer zu gleichen Produkten. Wird ein Fusionsanteil verwendet, handelt es sich dabei vorzugsweise um einen His-Tag. Die Reinigungsverfahren variieren je nach Expressionsvektor bzw. System.

Die vorliegende Erfindung umfaßt demnach eine gezielt veränderte Primär-
25 sequenz des rekombinanten Allergens rPhl p 1, die seine rekombinante Herstellung in bakteriellen bzw. anderen Expressionssystemen und die anschließende Reinigung ermöglicht.

Gegenstand der Erfindung sind somit auch DNA-Moleküle, welche für die erfindungsgemäßen Allergenvarianten kodieren.

30

Die rekombinanten Proteine sind autoproteolytisch inaktiv und können daher in stabiler monomerer Form in physiologischen, gepufferten oder je

nach Applikation in anderen Lösungen gelagert werden. Die T-Zell-Stimulierung zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen rekombinanten und natürlichem Phl p 1.

5 Die rekombinanten Allergenvarianten und die abgeleiteten Fragmente oder Varianten können somit zur Therapie von Graspollen-induzierten allergischen Erkrankungen genutzt werden.

Aufgrund dieser pharmazeutischen Eignung betrifft die vorliegende Erfindung die neuen Allergenvarianten auch in ihrer Eigenschaft als Arzneimittel.
10

Weiterhin können die rekombinant hergestellten Allergenvarianten und Fragmente zur Diagnostik von Pollenallergien genutzt werden.

Bei der Herstellung des gentechnisch veränderten Majorallergens Phl p 1 aus Lieschgras wird der Aminosäureaustausch durch gerichteten Nukleotidaustausch, beispielsweise mittels PCR, bewirkt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform, der Mutante rPhl p 1-A236C gemäß SEQ ID NO 2, wird das Alanin an Position 236 durch Cystein ausgetauscht. Die Austauschstelle kann jedoch auch an einer beliebigen anderen Stelle des Moleküls liegen. In der Regel wird sie jedoch im C-terminalen Bereich des Moleküls, vorzugsweise ab Position 140, insbesondere zwischen den Positionen 230 und 240 lokalisiert sein.
15
20

Als Folge des Austauschs wird gleichzeitig die für Phl p 1 bekannte proteolytische Aktivität eliminiert.
25

Als ein weiterer unerwarteter Effekt treten bei der erfindungsgemäßen Isolierung und Reinigung des Moleküls zwei Faltungsvarianten auf, die vollständig voneinander getrennt werden können.

30 Während sich die eine, als rPhl p 1-LM (LM = low molecular weight) bezeichnete Konformationsvariante aufgrund ihres ähnlichen bzw. identischen Laufverhaltens in der nicht reduzierenden SDS-PAGE (Abb. 1) und

der Gelfiltration (bspw. an Sepharacryl S-100, vgl. Abb. 2) zu dem natürlichen Protein sehr ähnlich verhält, liegt die zweite, als rPhl p 1-HM (HM = high molecular weight) bezeichnete Variante in einer anderen Faltungsform vor. Auch die IgE-Reaktivität differiert. Während rPhl p 1-LM eine dem natürlichen Protein vergleichbare Reaktivität aufweist, wird rPhl p 1-HM von IgE-Antikörpern weniger gut gebunden und ist wegen seiner Hypoallergenität in besonderem Maße für die spezifische Immuntherapie geeignet (s. Abb. 3).

Grundsätzlich sind jedoch beide Faltungsformen sowohl für therapeutische als auch diagnostische Anwendungen geeignet.

Gegenstand der Erfindung sind somit weiterhin unterschiedliche Faltungsformen der erfindungsgemäßen rPhl p 1-Allergenvariante und ihre Verwendung für therapeutische und diagnostische Zwecke.

Beide Faltungsvarianten sind leicht löslich, stabil monomer und haben keine nachweisbare proteolytische/autoproteolytische Aktivität.

Die erfindungsgemäßen Allergenvarianten können beispielweise nach den beiden nachfolgend skizzierten Herstellungsverfahren - mit oder ohne artifiziellen Fusionsanteil - erhalten werden:

1) Expression mit artifizielltem Fusionsanteil (His-Tag)

Im Fall der Verwendung eines His-Tags erfolgt die Reinigung des zunächst unlöslichen Rohproteins über mehrere biochemische Trennschritte, umfassend einen oder mehrere Metallionen-Chelat-Affinitätschromatographie-Schritte und die Abspaltung des His-Tags. Zur Vor- und Nachreinigung können verschiedene andere Chromatographien sowie De- und Renaturierungsschritte zum Einsatz kommen.

Herstellung der Faltungsform rPhI p 1-LM:

- Denaturierung der aus dem Wirtsorganismus isolierten Einschlußkörper mit Guanidiniumchlorid,
- Renaturierung des gelösten Proteins auf einer Chelat-Affinitätschromatographiesäule,
- Abspalten des His-Tags,
- erste Gelfiltration,
- Chelat-Affinitätschromatographie,
- Isolierung des Zielproteins aus dem Durchlauf, zweite, abschließende Gelfiltration.

Die andere Faltungsform - rPhI p 1-HM - kann bei dieser Reinigungsvariante durch Ausführen der folgenden Verfahrensschritte erhalten werden:

- Denaturierung der aus dem Wirtsorganismus isolierten Einschlußkörper mit Guanidiniumchlorid,
- Renaturierung des gelösten Proteins auf einer Chelat-Affinitätschromatographiesäule,
- Abspalten des His-Tags,
- erste Gelfiltration,
- Chelat-Affinitätschromatographie,
- Elution des Zielproteins mit einem Imidazolgradienten,
- zweite, abschließende Gelfiltration.

2) Expression ohne Fusionsanteil (ohne His-Tag)

- Denaturierung der aus dem Wirtsorganismus isolierten Einschlußkörper mit Guanidiniumchlorid, wobei wie weiter unten beschrieben in Abhängigkeit der Denaturierungsdauer die eine oder die andere Faltungsform erhalten wird.
- Renaturierung des gelösten Proteins durch Verdünnung in Pufferlösung,

- wobei vorzugsweise 20-50 mM Tris/HCl pH 7-8 zum Einsatz kommt, aber auch andere Puffer und pH-Werte (z.B. 7-10,5) möglich sind. Zur Verdünnung wird bevorzugt der Denaturierungsansatz zu einem Vielfachen seines Volumens (etwa das 10 bis 80fache, vorzugsweise das 20 bis 60fache Volumen) der vorzugsweise gerührten oder anderweitig durchmischten Pufferlösung - etwa durch Dekantieren, Pipettieren oder Pumpen - gegeben; jedoch kann auch die Pufferlösung zum Denaturierungsansatz gegeben werden. Die Geschwindigkeit der Zugabe ist unkritisch: so kann die gesamte Menge auf einmal innerhalb weniger Sekunden zugegeben werden oder aber - (vorzugsweise jedoch nicht zwingend) gleichmäßig - verteilt auf mehrere Stunden.
- Konzentration und Reinigung des renaturierten Proteins durch Chelat-Affinitätschromatographie und anschließende Elution mit einem Imidazolgradienten (es wird vorzugsweise ein Stufengradient verwendet, ein kontinuierlicher Gradient ist jedoch ebenfalls möglich). Alternativ oder zusätzlich zur Chelat-Affinitätschromatographie kann optional auch eine Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie und/oder eine Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt werden (die Moleküle sind vollständig chromatographisch zu bearbeiten).
- abschließende Gelfiltration.

- Die alternativen stabilen Faltungsformen LM und HM können hierbei gezielt mit minimaler Kreuzkontamination durch unterschiedliche Inkubationszeiten bei dem Denaturierungsschritt erhalten werden. Zur Herstellung der LM-Form kann dabei grundsätzlich zwischen etwa 1 und 50 Stunden inkubiert werden. In der Regel wird man sich jedoch in einem Bereich von 10 bis 40 Stunden, vorzugsweise 15 bis 30 bewegen, wobei ein Intervall von 18 bis 22 Stunden besonders bevorzugt ist.
- Für die HM-Variante werden deutlich längere Inkubationszeiten benötigt. Sie liegen in der Größenordnung von 60 bis 120 Stunden. Für gewöhnlich wird man jedoch 70 bis 100 Stunden inkubieren, besonders bevorzugt bewegt man sich dabei in einem Bereich von 80 bis 90 Stunden.

Auf den Denaturierungsschritt folgt in jedem Fall der zuvor beschriebene Verdünnungsschritt mit Pufferlösung.

Das Zwischenintervall (ca. 50 bis 60 Stunden) repräsentiert die Umbildungsphase. Durch den Verdünnungsschritt wird der Faltungsprozeß offenbar fixiert, es findet keine weitere Kinetik statt.

Die Feinreinigung zur Trennung von LM und HM ist möglich über eine Hydrophobe Interaktionschromatographie oder wird durch Gelfiltration erreicht, bei der die Formen deutlich unterschiedliche Retentionszeiten haben.

Die erfindungsgemäßen Allergenvarianten können in ihren Faltungsvarianten LM und HM in hoher Reinheit erhalten werden und haben wertvolle pharmazeutisch relevante Eigenschaften. So können sie als Gemisch aber auch einzeln zur Diagnostik (insbesondere rPhl p 1-LM wegen des Erhalts der IgE-Aktivität) und Therapie (insbesondere rPhl p 1-HM wegen der verminderten IgE-Aktivität) von allergischen Erkrankungen eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft daher ebenfalls die Verwendung der Allergenvarianten und/oder ihre pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur spezifischen Immuntherapie (Hyposensibilisierung) sowie Diagnostik von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist

Ferner ist Gegenstand der Erfindung eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eine erfindungsgemäße Allergenvariante und/oder ihre pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe. Hierbei können die erfindungsgemäßen Wirkstoffe zusammen mit mindestens einem festen, flüssigen und/oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff und

gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren weiteren Wirkstoffen in eine geeignete Dosierungsform gebracht werden.

5 Werden die den erfindungsgemäßen Allergenvarianten zugrunde liegenden DNA-Moleküle mit einem geeigneten Expressionsvektor ligiert, können diese Konstrukte zudem als Präparate für eine Immuntherapie (DNA-Vakzinierung) angewendet werden.

10 Gegenstand der Erfindung ist daher ebenfalls ein rekombinanter DNA-Expressionsvektor, enthaltend ein erfindungsgemäßes DNA-Molekül, zur Behandlung von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist, durch immuntherapeutische DNA-Vakzinierung.

15 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung des besagten Expressionsvektors und/oder seiner Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist, durch immuntherapeutische DNA-Vakzinierung.

20 Schließlich ist Gegenstand der Erfindung eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend den besagten Expressionsvektor und/oder seine pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe, zur Behandlung von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus
25 Lieschgras beteiligt ist, durch immuntherapeutische DNA-Vakzinierung.

30 Pharmazeutische Zubereitungen im Sinne dieser Erfindung können als Therapeutika in der Human- oder Veterinärmedizin verwendet werden. Als Trägerstoffe kommen organische oder anorganische Substanzen in Frage, die sich für die parenterale Applikation eignen und mit erfindungsgemäßen Allergenvarianten des Majorallergens Phl p 1 aus Lieschgras nicht reagie-

- ren. Zur parenteralen Anwendung dienen insbesondere Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige Lösungen, ferner Suspensionen, Emulsionen oder Implantate. Die erfindungsgemäßen Allergenvarianten können auch lyophilisiert und die erhaltenen Lyophilisate z.B. zur Herstellung von
- 5 Injektionspräparaten verwendet werden. Die angegebenen Zubereitungen können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe wie Gleit-, Konservierungs-, Stabilisierungs- und/oder Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Druckes, Puffersubstanzen und/oder mehrere weitere Wirkstoffe enthalten.
- 10 Weiterhin können durch entsprechende Formulierung der erfindungsgemäßen Allergenvarianten Depotpräparate, beispielsweise durch Adsorption an Aluminiumhydroxid, erhalten werden.
- 15 Naturgemäß sind über die erfindungsgemäßen Mutationen auch weitere punktuelle Veränderungen an anderen Positionen sowie sonstige Modifikationen – etwa zur Erhöhung der Hypoallergenität möglich. Bei diesen Modifikationen kann es sich beispielsweise um chemische Modifikationen des Allergenextrakts handeln (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (7), 377-382). Sie können
- 20 aber auch gentechnisch auf DNA-Ebene erfolgen, wobei z.B. Aminosäure-Insertionen, -Deletionen und -Austausche, Aufspaltungen des Proteins in Fragmente sowie Fusionen des Proteins oder seiner Fragmente mit anderen Proteinen oder Peptiden in Frage kommen.
- 25 Angesichts der hohen Sequenzhomologien innerhalb der Gruppe 1 Graspollenmajorallergene sind sämtliche, hier für Phl p 1 beschriebenen Effekte betreffend die Verbesserung der Löslichkeit durch Einführung eines Cys-Restes und das Auftreten von Faltungsvarianten auch für andere Vertreter dieser Gruppe zu erwarten.

Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, dass ein Fachmann die obige Beschreibung in weitestem Umfang nutzen kann. Die nachfolgend beispielhaft für die Variante rPhl p 1-A236C dargestellten Ausführungsformen gemäß der Tabellen 1 und 2 sind deswegen lediglich als beschreibende, keineswegs als in irgendeiner Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

Sämtliche Chromatographiematerialien werden von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland) kommerziell vertrieben.

Bei den beschriebenen Chelat-Affinitätschromatographien ist die Wahl des Metallions unkritisch, es kann sowohl Ni als auch Cu verwendet werden.

Beispiel 1: Gewinnung von rPhl p 1-A236C-LM und -HM

- Reinigungsvariante mit His-Tag

Die für das Phl p 1 kodierende Sequenz wurde mit 5'- und 3'-spezifischen Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert und in einen pProEx-Vektor (GIBCO, La Jolla, USA) über die Ehe I und Hind III Schnittstelle ligiert. Der 3'-Primer wurde an Basenposition 706/707 von GC nach TG derart verändert, daß aus einem für Alanin kodierendes ein für Cystein kodierendes Triplet entsteht (Essential Molecular Biology; T.A. Brown ed., IRL Press, Oxford, 1994). Die Transformation erfolgte in *E. coli* Origami. Der gewählte Ausgangsvektor pProEx liefert die N-terminalen Ende lokalisierte 6xHis Sequenz, gefolgt von einer Erkennungssequenz für die TEV-Protease. Die nach der bakteriellen Expression als unlösliche Aggregate vorliegenden rekombinanten, primär 6xHIS getaggten rPhl p 1-A236C-Moleküle werden nach Vorreinigung in 6 M Guanidiniumchlorid (GdmCl), 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, pH 8.0) gelöst. Es schließt sich eine zweistufige Ni-Chelat-Affinitätschromatographie an:

In einem ersten Schritt werden die unter denaturierenden Bedingungen an Chelating Sepharose gebundenen Proteine durch einen Gradienten über 90 min von der Denaturierungslösung in einen Puffer bestehend aus

50 mM Phosphatpuffer und 500 mM NaCl (pH 7.4) überführt. Es schließt sich eine Stufenelution mit 500 mM Imidiazol in Phosphatpuffer an. Das renaturierte Fusionsprotein wird mittels einer spezifischen TEV-Protease in rPhl p 1 und den 6xHis Fusionsanteil gespalten.

5 Zur Vorbereitung auf eine zweite Affinitätschromatographie wird eine Gelfiltration mit Sephadex G-25 und Phosphatpuffer als Elutionsmittel durchgeführt, wodurch das Imidiazol entzogen wird.

Das umgepufferte Proteingemisch wird nun zu einer zweiten Ni-Chelat-Affinitätschromatographie eingesetzt. Dabei befindet sich ein Teil des erfolgreich gespaltenen rPhl p 1 im Durchlauf. Es handelt sich hierbei um die LM-Form des Moleküls. An der Säule bleibt neben ungespaltenen Molekülen auch die Konformationsvariante HM haften, offenbar bedingt durch exponierte Histidinreste. Diese gesplattene Variante eluiert in einem Imidazolgradienten eher als die ungespaltenen Fusionsproteine, wodurch auch diese Form hochrein erhalten werden kann. In einem letzten Schritt wird zur Endreinigung und Überführung in ein gewünschtes Lösungsmittel eine Gelfiltration mit Superdex 75 durchgeführt.

Tab. 1 Übersicht über das erfindungsgemäße Herstellungs- und Reinigungsverfahren unter Verwendung eines His-Tags

20

25

30

- | | |
|--|--|
| 1. Expression | |
| 2. Isolierung der Inclusion Bodies | |
| 3. Denaturierung | |
| 4. Ni-Chelat-Affinitätschromatographie 1 (Renaturierung) | |
| 5. Abspaltung des His-Tags | |
| 6. Gelfiltration (Sephadex G-25) | |
| 7. Ni-Chelat-Affinitätschromatographie 2: | Durchlauf: rPhl p 1-LM
Eluat: rPhl p 1-HM,
ungespaltenes His-rPhl p 1-
Fusionsprotein |
| 8. Gelfiltration (Superdex 75) | |

Beispiel 2: Gewinnung von rPhI p 1-A236C-LM und -HM**- Reinigungsvariante ohne His-Tag**

Zunächst wird gemäß Beispiel 1 vorgegangen, wobei der gewählte Vektor jedoch als Primärprodukt kein Fusionsprotein liefert.

- 5 Nun werden die nach der bakteriellen Expression als unlösliche Aggregate (Inclusion bodies) vorliegenden rekombinanten, primär rPhI p 1-A236C-Moleküle, nach Vorreinigung in 6 M Guanidiumchlorid (GdmCl), 50 mM Tris/HCl, pH 8.0) gelöst. Es schließt sich eine 40fache Verdünnung in 20 mM Tris pH 8.0 an. Die Denaturierungslösung wird dazu in die mit einem
- 10 Magnetrüher gerührte Verdünnungslösung dekantiert

a) Herstellung der LM-Form

Die Inclusion bodies werden 20 h in der Denaturierungslösung inkubiert und anschließend wie oben beschrieben verdünnt.

15

b) Herstellung der HM-Form

Die Inclusion bodies werden 85 h in der Denaturierungslösung inkubiert und anschließend wie oben beschrieben verdünnt.

- 20 Dem jeweiligen Verdünnungs- (Renaturierungs-) Ansatz werden 500 mM NaCl zugesetzt. Die gelösten Moleküle im Renaturierungsansatz werden über eine Cu-Chelat-Affinitätschromatographie konzentriert und mit 200 mM Imidazol in Phosphatpuffer als Stufe eluiert (oder graduell durch 500 mM Imidazol in Phosphatpuffer).

- 25 Optional kann die Chelat-Affinitätschromatographie vor der Elution des Proteins zur Konditionierung derart benutzt werden, daß beispielsweise eine 3 M NaCl Lösung zum Waschen und eine 3 M NaCl, 200 mM Imidazol-Lösung zum Eluieren benutzt wird. Das stark salzhaltige Eluat könnte dann direkt für eine Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie eingesetzt werden.

- 30 In einem letzten Schritt wird zur Endreinigung und Überführung in ein gewünschtes Lösungsmittel eine Gelfiltration mit Superdex 75 durchgeführt.

Tab. 2 Übersicht über das erfindungsgemäße Herstellungs- und
Reinigungsverfahren ohne Verwendung eines His-Tags

5	1. Expression	
	2. Isolierung der Inclusion Bodies	
	3. Denaturierung	Dauer 20 h: LM Dauer 85 h: HM
	4. Verdünnung	
10	5. Cu-Chelat-Affinitätschromatographie	
	6. Gelfiltration (Superdex 75)	

**Beispiel 2: Unterschiedliche IgE-Bindungen des Wildtyps sowie der
Faltungsvarianten LM und HM der Allergenvariante rPhl p 1-A236C**

15 In einem gemäß Suck et al. (Int. Arch. Allergy Immunol. 2000; 121: 284-
291) durchgeführten EAST-Inhibitionsassay mit einem Allergiker-
Serumpool werden das natürliche nPhl p 1 und die rekombinanten rPhl p.1
Varianten HM sowie LM hinsichtlich der Stärke ihrer IgE-Bindung miteinan-
20 der verglichen (Abb. 3). Es zeigt sich, daß die Variante HM in ihrer IgE-
Bindung gegenüber dem natürlichen Phl p 1 Protein deutlich reduziert ist,
während die Variante LM eine mit dem natürlichen Phl p 1 Protein ver-
gleichbare IgE-Bindung aufweist.

25

30

Patentansprüche

1. Variante des Majorallergens Phl p 1 aus Lieschgras, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegenüber dem Wildtyp einen zusätzlichen Cys-Rest aufweist.
5
2. Allergenvariante nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich der zusätzliche Cys-Rest im carboxyterminalen Bereich befindet.
- 10 3. Allergenvariante nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sich der zusätzliche Cys-Rest in einer höheren als der Aminosäureposition 140 befindet
- 15 4. Allergenvariante nach einem oder mehreren der Ansprüche Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sich der zusätzliche Cys-Rest zwischen den Aminosäurepositionen 230 und 240 befindet
- 20 5. Allergenvariante nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der zusätzliche Cys-Rest aus einem Aminosäureaustausch hervorgegangen ist.
- 25 6. Allergenvariante rPhl p 1-A236C gemäß SEQ ID NO 2 nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der zusätzliche Cys-Rest durch Austausch von Ala 236 eingeführt wurde.
7. DNA-Molekül, welches für eine Allergenvariante nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 kodiert.
- 30 8. DNA-Molekül gemäß SEQ ID NO 1, welches für die Allergenvariante nach Anspruch 6 kodiert.

9. Verfahren zur Herstellung einer Variante des rekombinanten Majorallergens rPhl p 1 gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß nach an sich bekannten Methoden
- in das entsprechende Gen durch Insertion oder Austausch ein Basentriplett kodierend für einen Cys-Rest eingeführt wird,
 - das so veränderte Gen in einem Wirtsorganismus überexprimiert wird und
 - die durch Überexpression erhaltene Allergenvariante gereinigt wird.
10. Verfahren zur Herstellung und Aufreinigung einer Variante des rekombinanten Majorallergens rPhl p 1 gemäß Anspruch 9 in löslicher Form, dadurch gekennzeichnet, daß das zunächst unlösliche Rohprotein denaturiert, anschließend durch Verdünnung renaturiert und durch biochemische Reinigungsschritte gereinigt wird.
11. Verfahren zur Aufreinigung einer Variante des rekombinanten Majorallergens rPhl p 1 gemäß Anspruch 9 in löslicher Form, dadurch gekennzeichnet, daß ausgehend von dem zu Reinigungszwecken mit einem His-Tag versehenen überexprimierten, zunächst unlöslichen Rohprotein mehrere biochemische Reinigungsschritte, umfassend eine zweistufige Metallionen-Chelat-Affinitätschromatographien und die Abspaltung des His-Tags, ausgeführt werden.
12. Allergenvariante nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie in unterschiedlichen Faltungsformen vorliegt.
13. Faltungsform rPhl p 1-LM der Allergenvariante gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, erhältlich durch Ausführen der folgenden Verfahrensschritte:
- Überexprimieren der mit einem His-Tag versehenen rPhl p 1-Allergenvariante in einem Wirtsorganismus

- Denaturierung der aus dem Wirtsorganismus isolierten Einschlußkörper mit Guanidiniumchlorid
 - Renaturierung des gelösten Proteins auf einer Chelat-Affinitätschromatographiesäule
 - 5 - Abspalten des His-Tags
 - Gelfiltration
 - Erneute Chelat-Affinitätschromatographie
 - Isolierung des Zielproteins aus dem Durchlauf
 - Gelfiltration
 - 10
14. Faltungsform rPhl p 1-HM der Allergenvariante gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, erhältlich durch Ausführen der folgenden Verfahrensschritte:
- Überexprimieren der mit einem His-Tag versehenen rPhl p 1-Allergenvariante in einem Wirtsorganismus
 - 15 - Denaturierung der aus dem Wirtsorganismus isolierten Einschlußkörper mit Guanidiniumchlorid
 - Renaturierung des gelösten Proteins auf einer Chelat-Affinitätschromatographiesäule
 - 20 - Abspalten des His-Tags
 - Gelfiltration
 - Erneute Chelat-Affinitätschromatographie
 - Elution des Zielproteins mit einem Imidazolgradienten
 - Gelfiltration
 - 25
15. Allergenvariante nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 sowie 12 bis 14 als Arzneimittel.
16. Verwendung einer Allergenvariante gemäß Anspruch 15 und/oder ihre pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur spezifischen Immuntherapie von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist.
- 30

rallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist.

5 17. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eine Allergenvariante gemäß Anspruch 15 und/oder ihre pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe.

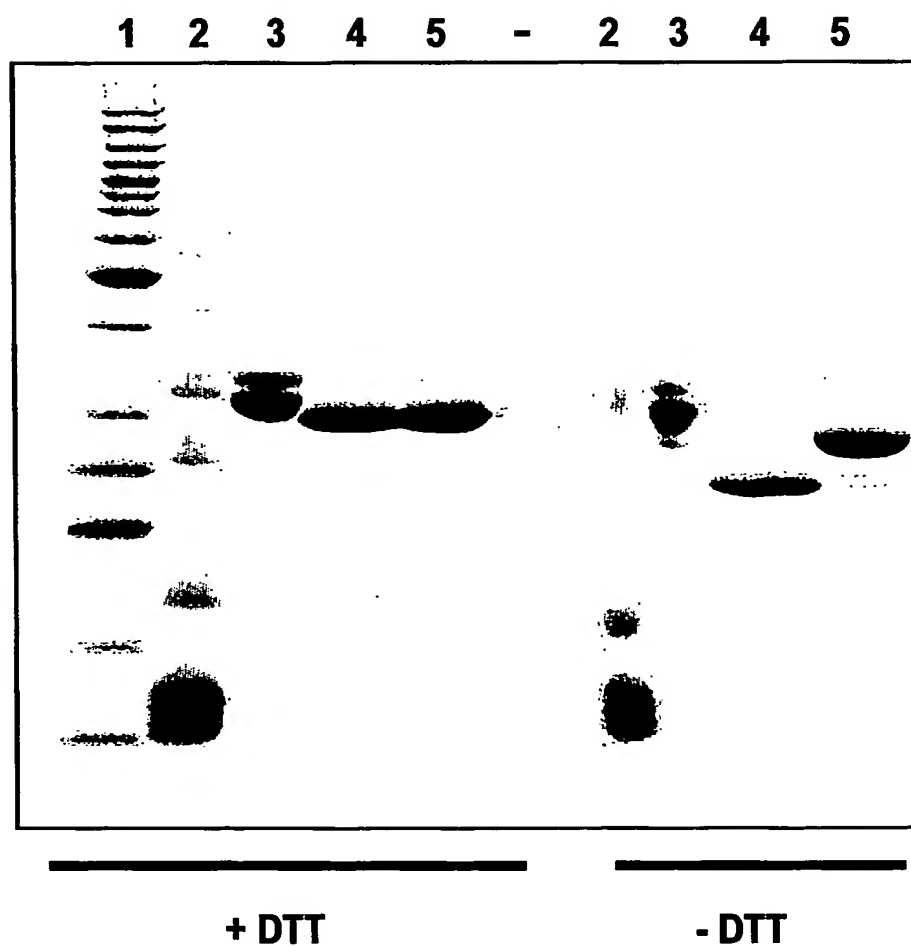
10 18. Verwendung einer Allergenvariante nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 sowie 12 bis 14 und/oder ihrer Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, zur *in vitro* Diagnostik von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist.

15 19. Rekombinanter DNA-Expressionsvektor, enthaltend ein DNA-Molekül nach Anspruch 7 oder 8, zur Behandlung von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist, durch immuntherapeutische DNA-Vakzinierung.

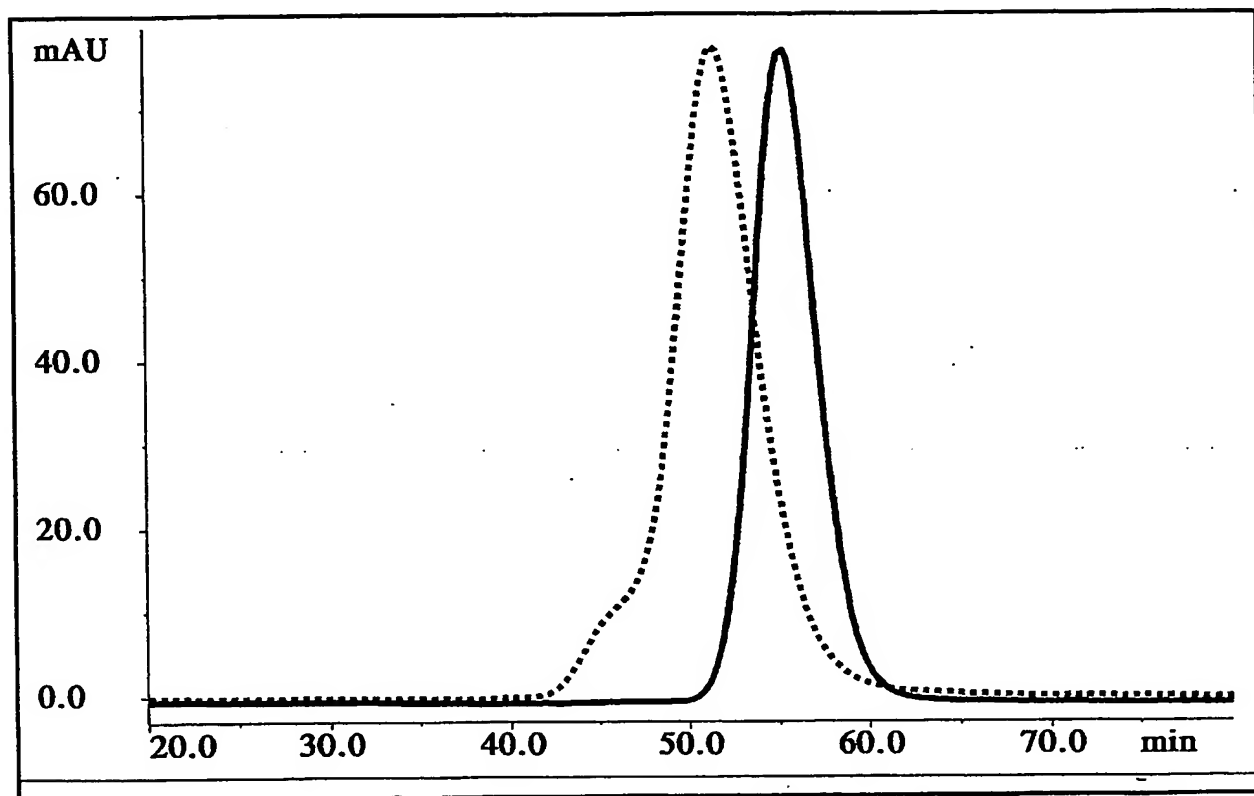
20 20. Verwendung des Expressionsvektors nach Anspruch 19 und/oder seiner Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist, durch immuntherapeutische DNA-Vakzinierung.

25 21. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend einen Expressionsvektor gemäß Anspruch 19 und/oder seine pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe, zur Behandlung von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist, durch immuntherapeutische DNA-Vakzinierung.
30

1 / 3

Abbildung 1:**SDS-PAGE von nPhl p 1, rPhl p 1-LM und rPhl p 1-HM**

2 / 3

Abbildung 2: Gelfiltration mit rPhl p 1-HM und rPhl p 1-LM

.....rPhl p 1-HM

_____ rPhl p 1-LM

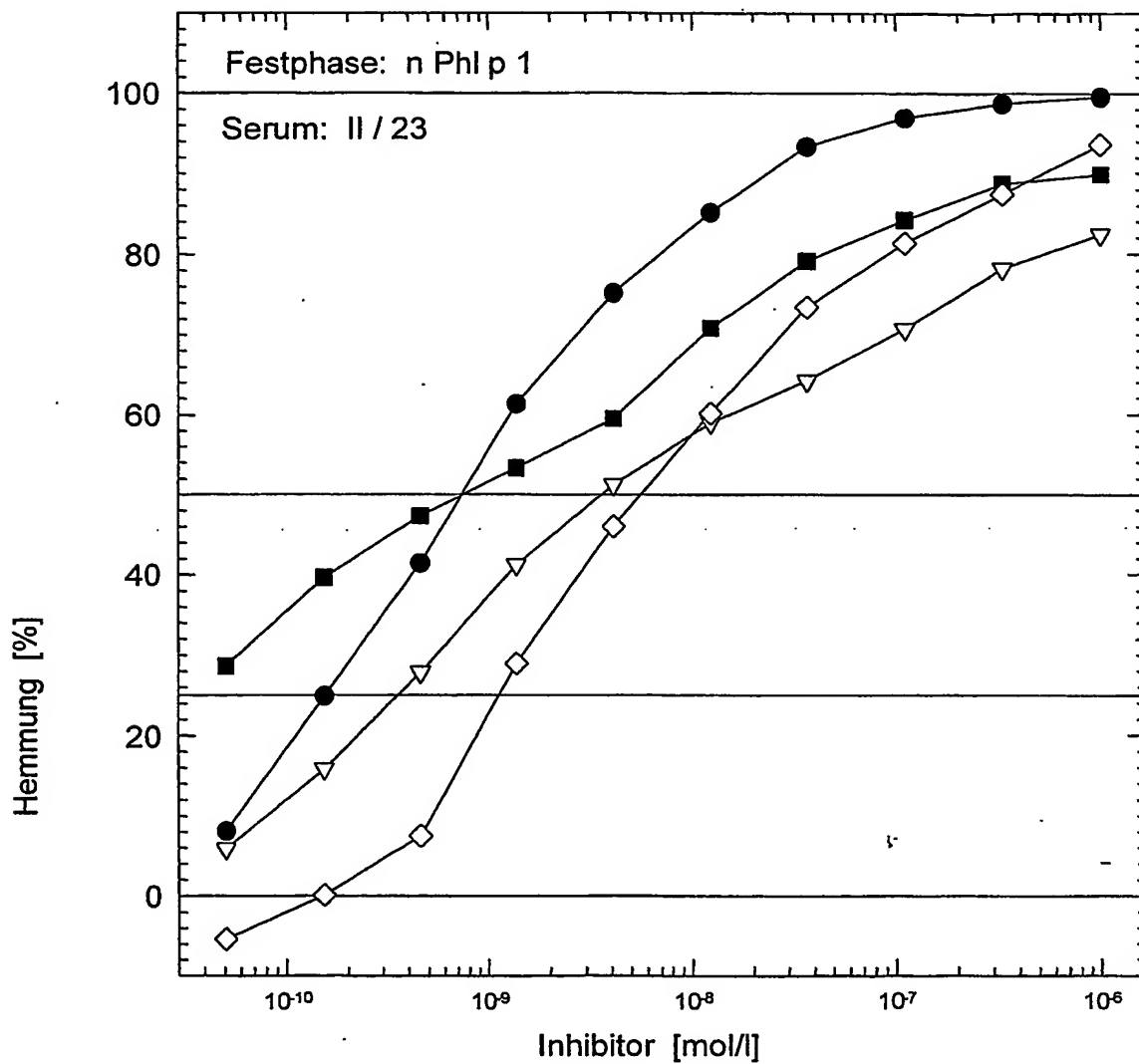
Elution bei: 51.41 min

55.22 min

3 / 3

Abbildung 3:

EAST-Inhibitionstest mit Faltungsvarianten rPhl p 1-T236C-LM und -HM



- n Phl p 1, ab 10^{-6} mol / l
- ▽— r Phl p 1 HM, ab 10^{-6} mol / l
- r Phl p 1 LM, ab 10^{-6} mol / l
- ◇— Phleum pratense - Extrakt, ab 50 μ g/ml

~6590434.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Merck Patent GmbH

<120> Varianten des Majorallergens Phl p 1 aus Lieschgras

<130> P 02/129

<140> EP 02 018 157.4

<141> 2002-08-19

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 723

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(720)

<223>

<400> 1

atc ccc aag gtt ccc ccc ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc ggc	48
Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Gly	
1 5 10 15	
aag tgg ctg gac gcg aag agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc	96
Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala	
20 25 30	
ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg tgc ggg tac aag gac gtg gac aag	144
Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys	
35 40 45	
ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tgc ggc aac acc ccc atc ttc aag	192
Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys	
50 55 60	
tcc ggc cgg ggc tgc ggc tcc tgc ttc gag atc aag tgc acc aag ccc	240

~6590434.txt

Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro
 65 70 75 80
 gag gcc tgc tcc ggc gag ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac gac aac 288
 Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
 85 90 95
 gag gag ccc atc gcc gcg tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc gcg ttc 336
 Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe
 100 105 110
 ggg tcc atg gcc aag aag ggc gac gag cag aag ctg cgc agc gcc ggc 384
 Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
 115 120 125
 gag gtg gag atc cag ttc cgc cgc gtc aag tgc aag tac ccg gag ggc 432
 Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly
 130 135 140
 acc aag gtg acc ttc cac gtg gag aag ggc tcc aac ccc aac tac ctg 480
 Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
 145 150 155 160
 gcg ctg ctg gtg aag ttt gtc gcc ggc gac ggc gac gtg gtg gcg gtg 528
 Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
 165 170 175
 gac atc aag gag aag ggc aag gac aag tgg atc gcg ctc aag gag tcg 576
 Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser
 180 185 190
 tgg gga gcc atc tgg agg atc gac acc ccg gag gtg ctc aag ggc ccc 624
 Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro
 195 200 205
 ttc acc gtc cgc tac acc acc gag ggc ggc acc aag ggc gag gcc aag 672
 Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys
 210 215 220
 gac gtc atc ccc gag ggc tgg aag gcc gac acc tgc tac gag tcc aag 720
 Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Cys Tyr Glu Ser Lys
 225 230 235 240
 tga 723
 <210> 2
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Phleum pratense
 <400> 2
 Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Gly
 1 5 10 15
 Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala
 20 25 30
 Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
 35 40 45

~6590434.txt

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
 50 55 60

Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro
 65 70 75 80

Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
 85 90 95

Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe
 100 105 110

Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
 115 120 125

Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly
 130 135 140

Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
 145 150 155 160

Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
 165 170 175

Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser
 180 185 190

Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro
 195 200 205

Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys
 210 215 220

Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Cys Tyr Glu Ser Lys
 225 230 235 240

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/08471

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/415 A61K39/36 C12N15/29 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 02 22679 A (RONCAROLO DANIELA ;VIOTTI ANGELO (IT); FALAGIANI PAOLO (IT); STURA) 21 March 2002 (2002-03-21) claims 1-12</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 December 2003

Date of mailing of the international search report

19/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Huber, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/08471

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SCHRAMM G ET AL: "Allergen engineering: variants of the timothy grass pollen allergen Phl p 5b with reduced IgE-binding capacity but conserved T cell reactivity" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILLIAMS & WILKINS CO, US, vol. 162, no. 4, 15 February 1999 (1999-02-15), pages 2406-2414, XP002216586 ISSN: 0022-1767 cited in the application page 2409, left-hand column -right-hand column, paragraph 1 page 2413, left-hand column, paragraph 1</p>	1,5,7,9, 15,16
A	<p>LAFFER S ET AL: "COMPLEMENTARY DNA CLONING OF THE MAJOR ALLERGEN PHL P I FROM TIMOTHY GRASS (PHLEUM PRATENSE); RECOMBINANT PHL P I INHIBITS IGE BINDING TO GROUP I ALLERGENS FROM EIGHT DIFFERENT GRASS SPECIES" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 94, no. 4, October 1994 (1994-10), pages 689-698, XP008001053 ISSN: 0091-6749 cited in the application the whole document</p>	1
A	<p>VRTALA S ET AL: "IMMUNOLOGIC CHARACTERIZATION OF PURIFIED RECOMBINANT TIMOTHY GRASS POLLEN (PHLEUM PRATENSE) ALLERGENS (PHL P 1, PHL P 2, PHL P 5)" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 97, no. 3, March 1996 (1996-03), pages 781-787, XP000953173 ISSN: 0091-6749 cited in the application page 782, right-hand column, paragraphs 2,3</p>	1
A	<p>GROBE K ET AL: "Grass group I allergens (Beta-expansins) are novel, papain-related proteinases" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 263, 1999, pages 33-40, XP002181033 ISSN: 0014-2956 cited in the application the whole document</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/08471

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0222679	A	21-03-2002	IT
		MI20001987 A1	12-03-2002
		AU 9555801 A	26-03-2002
		WO 0222679 A2	21-03-2002
		EP 1317484 A2	11-06-2003
		US 2002064530 A1	30-05-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/08471

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/415 A61K39/36 C12N15/29 C12N5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 02 22679 A (RONCAROLO DANIELA ;VIOTTI ANGELO (IT); FALAGIANI PAOLO (IT); STURA) 21. März 2002 (2002-03-21) Ansprüche 1-12 --- -/--	1



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

9. Dezember 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19/12/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Huber, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/08471

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SCHRAMM G ET AL: "Allergen engineering: variants of the timothy grass pollen allergen Phl p 5b with reduced IgE-binding capacity but conserved T cell reactivity" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILLIAMS & WILKINS CO, US, Bd. 162, Nr. 4, 15. Februar 1999 (1999-02-15), Seiten 2406-2414, XP002216586 ISSN: 0022-1767 in der Anmeldung erwähnt Seite 2409, linke Spalte -rechte Spalte, Absatz 1 Seite 2413, linke Spalte, Absatz 1</p>	1,5,7,9, 15,16
A	<p>LAFFER S ET AL: "COMPLEMENTARY DNA CLONING OF THE MAJOR ALLERGEN PHL P I FROM TIMOTHY GRASS (PHLEUM PRATENSE);RECOMBINANT PHL P I INHIBITS IGE BINDING TO GROUP I ALLERGENS FROM EIGHT DIFFERENT GRASS SPECIES" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, Bd. 94, Nr. 4, Oktober 1994 (1994-10), Seiten 689-698, XP008001053 ISSN: 0091-6749 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	1
A	<p>VRTALA S ET AL: "IMMUNOLOGIC CHARACTERIZATION OF PURIFIED RECOMBINANT TIMOTHY GRASS POLLEN (PHLEUM PRATENSE) ALLERGENS (PHL P 1, PHL P 2, PHL P 5)" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, Bd. 97, Nr. 3, März 1996 (1996-03), Seiten 781-787, XP000953173 ISSN: 0091-6749 in der Anmeldung erwähnt Seite 782, rechte Spalte, Absätze 2,3</p>	1
A	<p>GROBE K ET AL: "Grass group I allergens (Beta-expansins) are novel, papain-related proteinases" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, Bd. 263, 1999, Seiten 33-40, XP002181033 ISSN: 0014-2956 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/08471

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0222679 A	21-03-2002	IT MI20001987 A1	12-03-2002
		AU 9555801 A	26-03-2002
		WO 0222679 A2	21-03-2002
		EP 1317484 A2	11-06-2003
		US 2002064530 A1	30-05-2002
